

## TRAI DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 22 septembre 1999 (22.09.99)	
Demande internationale no PCT/FR98/02819	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 décembre 1998 (22.12.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 24 décembre 1997 (24.12.97)
Déposant DEROSE, Richard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

19 juillet 1999 (19.07.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TETAZ, Franck  
Aventis Cropscience S.A.  
DPI - 55, avenue René-Cassin  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

15 mars 2000 (15.03.00)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

PH 97089 PCT

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR98/02819

Date du dépôt international (jour/mois/année)

22 décembre 1998 (22.12.98)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse

RHONE-POULENC AGRO  
14/20, rue Pierre Baizet  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.  
55, avenue René-Cassin  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés  
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Margret Fourne-Godbers n

no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE COOPERATION EN MATIE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TETAZ, Franck  
Aventis Cropscience S.A.  
DPI - 55, avenue René-Cassin  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2000 (15.03.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT	
Demande internationale no PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 décembre 1998 (22.12.98)

## 1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant      ☐ l'inventeur      ☒ le mandataire      ☐ le représentant commun

Nom et adresse TETAZ, Franck Rhône-Poulenc Agro DPI - 14/20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone (33) 4 72 85 25 92	
	no de télécopieur (33) 4 72 85 28 43	
	no de téléimprimeur	

## 2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne      ☐ le nom      ☒ l'adresse      ☐ la nationalité      ☐ le domicile

Nom et adresse TETAZ, Franck Aventis Cropscience S.A. DPI - 55, avenue René-Cassin F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone (33) 4 72 85 25 92	
	no de télécopieur (33) 4 72 85 28 43	
	no de téléimprimeur	

## 3. Observations complémentaires, le cas échéant:

## 4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur      ☐ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale      ☒ aux offices élus concernés  
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international      ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Margret Fourné-Godbersen no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

mks  
supet daNOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

REÇU D.P.I.

24 MAR 2000

TETAZ, Franck  
Aventis Cropscience S.A.  
DPI - 55, avenue René Cassin  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2000 (15.03.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT	
Demande internationale no PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 décembre 1998 (22.12.98)

## 1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant    ☐ l'inventeur    ☐ le mandataire    ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHONE-POULENC AGRO 14/20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

## 2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne    ☒ le nom    ☒ l'adresse    ☐ la nationalité    ☐ le domicile

Nom et adresse AVENTIS CROPSCIENCE S.A. 55, avenue René-Cassin F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

## 3. Observations complémentaires, le cas échéant:

## 4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur    ☐ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale    ☒ aux offices élus concernés  
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international    ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Margret Fourne-Godbersen no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TETAZ, Franck  
Aventis Cropscience S.A.  
DPI - 55, avenue René-Cassin  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2000 (15.03.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT	
Demande internationale no PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 décembre 1998 (22.12.98)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur	<input checked="" type="checkbox"/> le mandataire
<input type="checkbox"/> le représentant commun		
Nom et adresse TETAZ, Franck Rhône-Poulenc Agro DPI - 14/20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone (33) 4 72 85 25 92	
	no de télécopieur (33) 4 72 85 28 43	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input type="checkbox"/> le nom	<input checked="" type="checkbox"/> l'adresse
<input type="checkbox"/> la nationalité		
<input type="checkbox"/> le domicile		
Nom et adresse TETAZ, Franck Aventis Cropscience S.A. DPI - 55, avenue René-Cassin F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone (33) 4 72 85 25 92	
	no de télécopieur (33) 4 72 85 28 43	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Margret Fourne-Godbersen
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

# TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

## PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

### NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

TETAZ, Franck  
Rhône-Poulenc Agro  
DPI-14/20, rue Pierre Baizet  
F-69009 Lyon  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) <b>29 janvier 1999 (29.01.99)</b>	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>PH 97089 PCT</b>	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Demande internationale no <b>PCT/FR98/02819</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>22 décembre 1998 (22.12.98)</b>
Date de publication internationale (jour/mois/année) <b>Pas encore publiée</b>	Date de priorité (jour/mois/année) <b>24 décembre 1997 (24.12.97)</b>
Déposant <b>RHONE-POULENC AGRO</b>	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
24 déce 1997 (24.12.97)	97/16727	FR	25 janv 1999 (25.01.99)

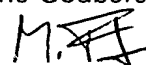
Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Margret Fourné-Godbersen

no de téléphone (41-22) 338.83.38



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

WO 99/34008  
PCT/FR98/02819

**PCT**

## AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TETAZ, Franck  
Rhône-Poulenc Agro  
DPI - 14/20, rue Pierre Baizet  
F-69009 Lyon  
FRANCE

**REÇU D.P.I.**

**16 JUL. 1999**

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 juillet 1999 (08.07.99)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT		<b>AVIS IMPORTANT</b>
Demande internationale no PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 décembre 1998 (22.12.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 24 décembre 1997 (24.12.97)
Déposant RHONE-POULENC AGRO etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

AL,AP,BA,BB,BG,BR,CA,CU,CZ,EA,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,LK,LR,LT,LV,MG,MK,MN,MX,NO,  
NZ,OA,PL,RO,SG,SI,SK,SL,TR,TT,UA,UZ,VN,YU

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 08 juillet 1999 (08.07.99) sous le numéro WO 99/34008

### RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

### RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

P I

## REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

servé à l'office récepteur

PCT/FR 98/02819

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) PH 97089 PCT

## Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

Procédé de préparation enzymatique d'homogénisate

## Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

RHONE-POULENC AGRO  
14/20 Rue Pierre Baizet  
69009 LYON  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone  
(33) 4 72 85 25 92

n° de télécopieur  
(33) 4 72 85 28 43

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :

FR

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est  
déposant pour :

tous les Etats  
désignéstous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amériqueles Etats-Unis d'Amérique  
seulementles Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

## Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

DEROSE Richard  
31 Rue du Bois Guillaume  
91000 EVRY France

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée,  
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

US

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est  
déposant pour :

tous les Etats  
désignéstous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amériqueles Etats-Unis d'Amérique  
seulementles Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire
☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

## Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN: OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est : a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme :



mandataire



représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

TETAZ Franck  
RHONE-POULENC AGRO  
DPI - 14/20 Rue Pierre Baizet  
69009 LYON FRANCE

n° de téléphone  
(33) 4 72 85 25 92

n° de télécopieur  
(33) 4 72 85 28 43

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est, n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.



## Suite du cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

*Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

SAILLAND Alain  
38 Rue Albert Chalinel  
69009 LYON FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☒ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

FR

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☐ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☐ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☐ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☐ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

## Cadre n° V DESIGNATION ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) *toucher les cases appropriées: une au moins doit l'être*

## Brevet régional

- ☒ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ EA Brevet eurasiatique : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasiatique et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) **GW Guinée Bissau**

## Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie                                    | <input type="checkbox"/> LS Lesotho  |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie   | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie                              |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche  | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie                                  | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie                              |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan   | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine                         | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade                                    | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie                                   | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil                                     | <input type="checkbox"/> MW Malawi   |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus   | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                                     | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège                               |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein                         | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine                                      | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba                                       | <input type="checkbox"/> PT Portugal   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque                         | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie                              |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne   | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie                             |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark  | <input type="checkbox"/> SD Soudan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie                                    | <input type="checkbox"/> SE Suède  |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne   | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour                             |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande  | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie                              |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni   | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone                          |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana   | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan                                      |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie  | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan                                     |
| <input type="checkbox"/> <del>GW Guinée-Bissau</del>                              | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie                                  | <input type="checkbox"/> UG Ouganda  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël                                     | <input type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande                                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon                                      | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan                           |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya   | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam                              |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan  | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR République de Corée                        |  |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan  |  |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Libéria                                    |  |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☒ IN Inde
- ☒ GD Grenade

**Déclaration concernant les désignations de précaution :** outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

## Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITE

☐ D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.

Date de dépôt de la demande antérieure (jour mois année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale pays	demande régionale : office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 24.12.97 (24 Décembre 97)	97 16727	FRANCE		
(2)				
(3)				

☐ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) :

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

## Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :

ISA/

Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :

Date (jour/mois/année)

Numéro

Pays (ou office régional)

## Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :

requête : 4  
description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 7  
revendications : 1  
abrégé : 1  
dessins :  
partie de la description réservée au listage des séquences :  
Nombre total de feuilles : 13

Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :

- ☒ feuille de calcul des taxes
- ☒ pouvoir distinct signé
- ☐ copie du pouvoir général: numéro de référence, le cas échéant :
- ☐ explication de l'absence d'une signature
- ☒ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
- ☐ traduction de la demande internationale en (langue) :
- ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
- ☐ listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur
- ☐ autres éléments (préciser) :

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

Langue de dépôt de la demande internationale :

## Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

RHONE-POULENC AGRO

TETAZ Franck

pg 1889

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	22 DEC. 1998	2. Dessins :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :		<input type="checkbox"/> reçus :
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :		<input type="checkbox"/> non reçus :
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA/	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.	

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international

# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/FR 98 / 0 2 8 1 9

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

PH 97089 PCT

**Box No. I TITLE OF INVENTION**

Method for enzymatic preparation of homogentisate

**Box No. II APPLICANT**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RHONE-POULENC AGRO  
14/20 Rue Pierre Baizet  
69009 LYON  
FRANCE

☐ This person is also inventor.

Telephone No.  
(33) 4 72 85 25 92

Facsimile No.  
(33) 4 72 85 28 43

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant  
for the purposes of:

☐ all designated  
States

☒ all designated States except  
the United States of America

☐ the United States  
of America only

☐ the States indicated in  
the Supplemental Box

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

DEROSE Richard  
31 Rue du Bois Guillaume  
91000 EVRY France

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box  
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

FR

This person is applicant  
for the purposes of:

☐ all designated  
States

☐ all designated States except  
the United States of America

☒ the United States  
of America only

☐ the States indicated in  
the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf  
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

TETAZ Franck  
RHONE-POULENC AGRO  
DPI - 14/20 Rue Pierre Baizet  
69009 LYON FRANCE

Telephone No.  
(33) 4 72 85 25 92

Facsimile No.  
(33) 4 72 85 28 43

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box N . III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SAILLAND Alain  
38 Rue Albert Châlinel  
69009 LYON FRANCE

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line) ..... **GW** Guinea-Bissau .....

**National Patent** (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania .....                               | <input type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho .....  |
| <input type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania .....                                 |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria .....  | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia .....                                    |
| <input type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan .....                                       | <input type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova .....                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina .....                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia ..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia .....                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil .....                                | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi .....   |
| <input type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway .....                                    |
| <input type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein .....             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba .....                                  | <input type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania .....                                   |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany .....  | <input type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation .....                                   |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark .....  | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia .....                               | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden .....   |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore .....                                 |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia .....                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia .....                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone .....                              |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana .....  | <input type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan .....   |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia .....   | <input type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan .....   |
| <input type="checkbox"/> <b>GW</b> <del>Guinea-Bissau</del> .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago .....                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine .....                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia .....                             | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel .....                                | <input type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America .....                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam .....                                  |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia .....                                |
| <input type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan .....                                       | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea ..... |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea .....                     |   |
| <input type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan .....                                       |   |
| <input type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia .....                                      |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka .....                             |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia .....                               |   |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☒ **India** .....
- ☒ **Grenada** .....

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

**Box No. VI PRIORITY CLAIM**☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 24.12.97 (24 December 97)	97/16,727	FRANCE		
item (2)				
item (3)				

☐ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(iii)). See Supplemental Box

**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

**Choice of International Searching Authority (ISA)**  
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen: the two-letter code may be used):

ISA /

**Request to use results of earlier search; reference to that search** (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

**Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING**

This international application contains the following number of sheets:

request : 4  
description (excluding  
sequence listing part) : 7  
claims : 1  
abstract : 1  
drawings :  
sequence listing part  
of description :  
Total number of sheets : 13

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- ☒ fee calculation sheet
- ☒ separate signed power of attorney
- ☐ copy of general power of attorney: reference number, if any:
- ☐ statement explaining lack of signature
- ☒ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- ☐ translation of international application into (language):
- ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- ☐ other (specify):

Figure of the drawings which  
should accompany the abstract:

Language of filing of the  
international application:

**Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

RHONE-POULENC AGRO

[signature]

TETAZ Franck pg 1889

1. Date of actual receipt of the purported international application: 22 DEC. 1998		2. Drawings:  <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau:

For International Bureau use only

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE  
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL,

Destinataire:

TETAZ, Franck  
RHONE-POULENC AGRO  
14/20, rue Pierre Baizet  
F-69009 Lyon  
FRANCE

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU  
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE  
INTERNATIONAL  
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition  
(jour/mois/année)

13.01.00

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
PH-97089 PCT

**NOTIFICATION IMPORTANTE**

Demande internationale No.  
PCT/FR98/02819

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
22/12/1998

Date de priorité (jour/mois/année)  
24/12/1997

Déposant

RHONE-POULENC AGRO

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

## 4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

DA ROCHA, O.

Tél. +49 89 2399-8101







# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT		<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/12/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 24/12/1997	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P7/42			
Déposant RHONE-POULENC AGRO			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/07/1999		Date d'achèvement du présent rapport 3.01.00	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu-d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Boletti-Cremers, K N° de téléphone +49 89 2399 8541 	

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02819

**I. Bas du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-7 version initiale

**Revendications, N°:**

1-11 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :  
☐ des revendications, n°s :  
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-11
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-11
	Non : R vendications

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02819

---

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**POINT V.**

1. Les documents suivants , cités dans le RdR International , ont été considérés comme pertinents pour l'examen de la présente demande . Leur numérotation sera conservée pour la suite de la procédure :

- (1) EP-A-0 343 330
- (2) WO-A-93 08295.
- (3) C. A., vol. 123, no. 15, 9 octobre 1995 ; abstract no. 193271, & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6.
- (4) CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139.
- (5) JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137.
- (6) JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285.

2. Dans la mesure où aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue la préparation globale d' HMO au départ de HPP par la voie tombant sous l' énoncé des revendications de procédé de la présente demande , celles ci peuvent être reconnues comme nouvelles par rapport à l' art antérieur contenu dans les documents (1) à (6) .

3. Dans la mesure où le contenu des documents (3) , (5) et (6) indique que la deuxième étape du procédé revendiqué se fonde sur un principe d' analogie , alors que le contenu de (4) indique que la première étape du procédé revendiqué se fonde également sur un procédé d' analogie , le procédé revendiqué est considéré comme issu de la combinaison des enseignements de (3), (5) et (6) avec (4) et ne peut être reconnu comme inventif en l' état .

Lors de l' entrée de la demande dans la phase régionale , la Demanderesse sera, par conséquent , invitée à fournir toute argumentation ou évidence permettant d'établir l' activité inventive par rapport aux autres procédés de synthèse enzymatique de HMO des arts antérieurs (3), (5), et (6) qui constituent l'art antérieur

le plus rapproché de la demande, puisqu'ils concernent également la synthèse de HMO par une voie différente.

**POINT VIII.**

Dans la mesure où la partie caractérisante du procédé, à savoir les enzymes "appropriés" permettant la bonne mise en oeuvre du procédé revendiqué, est énoncée en des termes fonctionnels qui se réfèrent également au résultat souhaité, c.à.d. les synthèses de HPA et du HMO, l'objet de la demande selon la revendication 1 est considéré comme dépourvu de clarté et la Demanderesse sera priée de reformuler ces expressions de manière à pourvoir à une reconnaissance de l'activité inventive sans ambiguïté lors de l'entrée de la demande dans la phase régionale.

**POINT VII.**

(a) Il y aurait lieu de citer (1) et (2) dans la description et de les discuter brièvement.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 15 Feb. 2000

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

PCT

17<sup>T</sup>



Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 97089 PCT	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02819	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/12/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 24/12/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P7/42		
Déposant RHONE-POULENC AGRO		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/07/1999	Date d'achèvement du présent rapport 13.01.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Boletti-Cremers, K N° de téléphone +49 89 2399 8541 

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02819

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-7                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-11                    version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description,    pages :  
☐ des revendications, n°s :  
☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-11
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-11
	Non : Revendications

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02819

---

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**



**POINT V.**

1. Les documents suivants , cités dans le RdR International , ont été considérés comme pertinents pour l'examen de la présente demande . Leur numérotation sera conservée pour la suite de la procédure :

- (1) EP-A-0 343 330
- (2) WO-A-93 08295.
- (3) C. A., vol. 123, no. 15, 9 octobre 1995 ; abstract no. 193271, & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6.
- (4) CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139.
- (5) JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137.
- (6) JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285.

2. Dans la mesure où aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue la préparation globale d' HMO au départ de HPP par la voie tombant sous l' énoncé des revendications de procédé de la présente demande , celles ci peuvent être reconnues comme nouvelles par rapport à l' art antérieur contenu dans les documents (1) à (6) .

3. Dans la mesure où le contenu des documents (3) , (5) et (6) indique que la deuxième étape du procédé revendiqué se fonde sur un principe d' analogie , alors que le contenu de (4) indique que la première étape du procédé revendiqué se fonde également sur un procédé d' analogie , le procédé revendiqué est considéré comme issu de la combinaison des enseignements de (3), (5) et (6) avec (4) et ne peut être reconnu comme inventif en l' état .

Lors de l' entrée de la demande dans la phase régionale , la Demanderesse sera, par conséquent , invitée à fournir toute argumentation ou évidence permettant d'établir l' activité inventive par rapport aux autres procédés de synthèse enzymatique de HMO des arts antérieurs (3), (5), et (6) qui constituent l'art antérieur

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

Demande internationale n° PCT/FR98/02819

le plus ~~pro~~proché de la demande, puisqu' ils concernent également la synthèse de ~~par~~ par une voie différente.

**POINT VIII.**

Dans la mesure où la partie caractérisante du procédé , à savoir les enzymes "appropriés" permettant la bonne mise en oeuvre du procédé revendiqué , est énoncée en des termes fonctionels qui se réfèrent également au résultat souhaité , c.à.d. les synthèses de HPA et du HMO , l' objet de la demande selon la revendication 1 est considéré comme dépourvu de clarté et la Demanderesse sera priée de reformuler ces expressions de manière à pourvoir à une reconnaissance de l' activité inventive sans ambiguïté lors de l' entrée de la demande dans la phase régionale .

**POINT VII.**

(a) Il y aurait lieu de citer (1) et (2) dans la description et de les discuter brièvement .

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

[stamp]

To:

TETAZ, Franck  
RHONE-POULENC AGRO  
14/20, rue Pierre Baizet  
F-69009 Lyon  
FRANCE

## PCT

### NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)

1 3. 01. 00

Applicant's or agent's file reference  
PH 97089 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/FR98/02819

International filing date (day/month/year)  
22/12/1998

Priority date (day/month/year)  
24/12/1997

Applicant  
RHONE-POULENC AGRO

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39.1) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PTO/PCT Rec'd 13 OCT 2000

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

DA ROCHA, O.

Tel. +49 89 2399-8101



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH 97089 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02819	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 22 December 1998 (22.12.98)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 24 December 1997 (24.12.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 7/42		
Applicant AVENTIS CROPSCIENCE S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 July 1999 (19.07.99)	Date of completion of this report 13 January 2000 (13.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02819

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-7, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-11, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 98/02819

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

1. The following documents, which are cited in the international search report, have been considered to be relevant for the examination of the present application. The numbers below will be used throughout the proceedings:

- (1) EP-A-0 343 330
- (2) WO-A-93 08295
- (3) C.A., vol. 123, no. 15, 9 October 1995; abstract no.193271 & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6.
- (4) CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1997, pages 1128-1139.
- (5) JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137.
- (6) JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285.

2. In as much as none of the above-cited documents discloses the general preparation of HMO from HPP using the method which comes under the disclosure of the method claims of the present application, these claims can be recognised as being novel over the prior art contained in documents (1) to (6).

3. In as much as the content of documents (3), (5) and (6) indicates that the second step of the claimed method is based on an analogy principle, while the content of (4) indicates that the first step of the claimed method is also based on an analogy method, the claimed method is considered to be derived from the combination of teaching from (3), (5) and (6) with (4) and cannot be recognised as being inventive.

When the application enters into the regional phase, the applicant will, therefore, be required to provide all the arguments and evidence in order to establish an inventive step in relation to other methods of enzyme synthesis of HMO from the prior art (3), (5) and (6), which constitute the prior art closest to the application, since they also relate to HMO synthesis using a different method.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In as much as the characterising portion of the method, i.e. "relevant" enzymes which enable the correct implementation of the claimed method, is disclosed in functional terms which also refer to the desired result, i.e. the synthesis of HPA and HMO, the subject matter of the application according to Claim 1 is considered to be lacking in clarity. The applicant will be required to reformulate these expressions in order to provide for an unambiguous recognition of inventive step when the application enters into the regional phase.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 98/02819

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

(1) and (2) should have been cited in the description and briefly discussed.

# PATENT COOPERATION TREATY



## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference PH 97089 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02819	International filing date (day/month/year) 22/12/1998	Priority date (day/month/year) 24/12/1997
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P7/42		
Applicant RHONE-POULENC AGRO		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 5 sheets including this title page.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings amended during international preliminary examination and/or containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of PCT Administrative Instructions).</p> <p>These annexes consist of a total of        sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>

Date of submission of the demand 19/07/1999	Date of completion of this report [illegible]
<b>Name and mailing address of the IPEA/</b>   European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	<b>Authorized officer:</b>  Boletti-Cremers, K  Telephone No. +49 89 2399 8541  

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR98/02819

---

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments.)*:

**Description, pages:**

1-7 as originally filed

**Claims, No.:**

1-11 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:

☐ the claims, Nos.:

☐ the drawings, sheets:

3. ☐ The present report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated as follows (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty	Yes:	Claims	1-11
	No:	Claims	
Inventive Step	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-11
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-11
	No:	Claims	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR98/02819

---

2. Citations and explanations

**see separate sheet**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

**see separate sheet**

POINT V.

1. The following documents, which are cited in the International SR, were considered to be relevant for the examination of the present application. Their numbering will be conserved for the rest of the proceedings:

- (1) EP-A-0 343 330
- (2) WO-A-93 08295
- (3) C.A., vol. 123, No. 15, 9 October 1995;  
Abstract No. 193271, & SEIMEI KOGAKU KOGYO  
GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2),  
33-6.
- (4) CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Vol. 23,  
1997, pages 1128-1139.
- (5) JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING,  
Vol. 81, No. 2, 1996, pages 133-137.
- (6) JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 121, No. 1,  
1975, pages 272-285.

2. Since none of the documents cited above discloses the overall preparation of HMO starting from HPP via the pathway which is covered by the wording of the method claims of the present application, they

may be recognized as being novel with respect to the prior art contained in documents (1) to (6).

3. Since the content of documents (3), (5) and (6) indicates that the second step of the claimed method is based on a principle of analogy, while the content of (4) indicates that the first step of the claimed method is also based on a method of analogy, the claimed method is considered as being derived from the combination of the teachings of (3), (5) and (6) with (4), and cannot be recognized as inventive as it currently stands. At the time of the application's entry into the regional phase, the Applicant will consequently be asked to supply any argument or evidence which makes it possible to establish the inventive step with respect to the other methods for enzymatic synthesis of HMO of the prior arts (3), (5) and (6), which constitute the prior art which is closest to the application, since they also concern the synthesis of HMO by a different pathway.

POINT VIII.

Since the characterizing part of the method, i.e. the "suitable" enzymes which allow the correct implementation of the method claimed, is set out in functional terms which also refer to the desired result, i.e. the syntheses of HPA and of HMO, the subject matter of the application according to Claim 1 is considered to be lacking in clarity, and the Applicant will be requested to reformulate these expressions so as to provide an unambiguous recognition of the inventive step, at the time of the application's entry into the regional phase.

POINT VII.

- (a) There is good reason to cite (1) and (2) in the description and to briefly discuss them.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 98/02819

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12P7/42 C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 343 330 A (MILES INC) 29 November 1989 cited in the application see the whole document ---	1-10
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 15, 9 October 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 193271, SUEMORI, AKIO ET AL: "L-Phenylalanine and L-tyrosine degradative pathways in Rhodococcus erythropolis" XP002079481 see abstract & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6 CODEN: SKGIEM; ISSN: 0919-5351, 1995, ---	1-10

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 1999

Date of mailing of the international search report

18/03/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02819

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BLAKLEY E R: "The catabolism of L-tyrosine by an Arthrobacter sp." CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139, XP002079478 cited in the application see abstract see page 1132 - page 1134</p>	4
A	<p>SUEMORI A ET AL: "Purification and characterisation of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from Rhodococcus erythropolis." JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137, XP002079479 cited in the application see abstract see figure 1</p>	7
A	<p>HARELAND W A ET AL: "Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from Pseudomonas acidovorans." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285, XP002079480 cited in the application see abstract</p>	8
A	<p>WO 93 08295 A (BASF AG) 29 April 1993 cited in the application see examples 2-5</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 98/02819

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0343330	A	29-11-1989	US 4877728	31-10-1989
			JP 1277495	07-11-1989
			US 4956279	11-09-1990
WO 9308295	A	29-04-1993	DE 4134774	06-05-1993
			AT 169961	15-09-1998
			CA 2121048	29-04-1993
			DE 59209468	24-09-1998
			EP 0609254	10-08-1994
			ES 2118828	01-10-1998
			JP 7500498	19-01-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No  
PCT/FR 98/02819

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C12P7/42 C12N9/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12P C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 343 330 A (MILES INC) 29 novembre 1989 cité dans la demande voir le document en entier	1-10
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 15, 9 octobre 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 193271, SUEMORI, AKIO ET AL: "L-Phenylalanine and L-tyrosine degradative pathways in Rhodococcus erythropolis" XP002079481 voir abrégé & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6 CODEN: SKGIEM; ISSN: 0919-5351, 1995, --- -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document antérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  11 mars 1999		Date de réception du présent rapport de recherche internationale  18/03/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Lejeune, R

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BLAKLEY E R: "The catabolism of L-tyrosine by an Arthrobacter sp." CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139, XP002079478 cité dans la demande voir abrégé voir page 1132 - page 1134 ---	4
A	SUEMORI A ET AL: "Purification and characterisation of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from Rhodococcus erythropolis." JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137, XP002079479 cité dans la demande voir abrégé voir figure 1 ---	7
A	HARELAND W A ET AL: "Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from Pseudomonas acidovorans." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285, XP002079480 cité dans la demande voir abrégé ---	8
A	WO 93 08295 A (BASF AG) 29 avril 1993 cité dans la demande voir exemples 2-5 -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De le Internationale No  
PCT/FR 98/02819

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0343330 A	29-11-1989	US 4877728 A	31-10-1989
		JP 1277495 A	07-11-1989
		US 4956279 A	11-09-1990
WO 9308295 A	29-04-1993	DE 4134774 A	06-05-1993
		AT 169961 T	15-09-1998
		CA 2121048 A	29-04-1993
		DE 59209468 D	24-09-1998
		EP 0609254 A	10-08-1994
		ES 2118828 T	01-10-1998
		JP 7500498 T	19-01-1995

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International patent classification<sup>6</sup>:</b>  C12P 7/42, C12N 9/02	<b>A1</b>	<b>(11) International publication number:</b> WO 99/34008  <b>(43) International publication date:</b> 8 July 1999 (08.07.99)
<b>(21) International application number:</b> PCT/FR98/02819 <b>(22) International filing date:</b> 22 December 1998 (22.12.98) <b>(30) Data relating to the priority:</b> 97/16,727 24 December 1997 (24.12.97) FR <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (US only):</b> DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Albert Chalinel, F-69009 (FR). <b>(74) Representative:</b> TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, DPI - 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).		<b>(81) Designated states:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> With the International Search Report.

As printed

**(54) Title:** METHOD FOR ENZYMATIC PREPARATION OF HOMOGENTISATE**(54) Titre:** PROCEDE DE PREPARATION ENZYMATIQUE D'HOMOGENTISATE**(57) Abstract**

The invention concerns a method for enzymatic preparation of homogentisate (HMO) from 4-hydroxypyruvate (HPP), characterised in that it consists in carrying out in a suitable reaction medium the following enzymatic reactions: enzymatic conversion of HPP into 4-hydroxyphenylacetate (HPA) with a first appropriate enzyme; then an enzymatic conversion of HPA into HMO with a second appropriate enzyme.

**(57) Abrégé**

La présente invention concerne un procédé de préparation enzymatique d'homogentisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes: conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis, conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.

# **ONLY FOR INFORMATION**

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

<b>AL</b>	Albania	<b>ES</b>	Spain	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slovenia
<b>AM</b>	Armenia	<b>FI</b>	Finland	<b>LT</b>	Lithuania	<b>SK</b>	Slovakia
<b>AT</b>	Austria	<b>FR</b>	France	<b>LU</b>	Luxembourg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australia	<b>GA</b>	Gabon	<b>LV</b>	Latvia	<b>SZ</b>	Swaziland
<b>AZ</b>	Azerbaijan	<b>GB</b>	United Kingdom	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Chad
<b>BA</b>	Bosnia-Herzegovina	<b>GE</b>	Georgia	<b>MD</b>	Republic of Moldova	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagascar	<b>TJ</b>	Tajikistan
<b>BE</b>	Belgium	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Former Yugoslav Republic of Macedonia	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Greece			<b>TR</b>	Turkey
<b>BG</b>	Bulgaria	<b>HU</b>	Hungary	<b>ML</b>	Mali	<b>TT</b>	Trinidad and Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Ireland	<b>MN</b>	Mongolia	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brazil	<b>IL</b>	Israel	<b>MR</b>	Mauritania	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Iceland	<b>MW</b>	Malawi	<b>US</b>	United States of America
<b>CA</b>	Canada	<b>IT</b>	Italy	<b>MX</b>	Mexico	<b>UZ</b>	Uzbekistan
<b>CF</b>	Central African Republic	<b>JP</b>	Japan	<b>NE</b>	Niger	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Congo	<b>KE</b>	Kenya	<b>NL</b>	Netherlands	<b>YU</b>	Yugoslavia
<b>CH</b>	Switzerland	<b>KG</b>	Kyrgyzstan	<b>NO</b>	Norway	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Ivory Coast	<b>KP</b>	Democratic People's Republic of Korea	<b>NZ</b>	New Zealand		
<b>CM</b>	Cameroon			<b>PL</b>	Poland		
<b>CN</b>	China	<b>KR</b>	Republic of Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CU</b>	Cuba	<b>KZ</b>	Kazakhstan	<b>RO</b>	Romania		
<b>CZ</b>	Czech Republic	<b>LC</b>	Saint Lucia	<b>RU</b>	Russian Federation		
<b>DE</b>	Germany	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DK</b>	Denmark	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Sweden		
<b>EE</b>	Estonia	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapore		

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 7/42, C12N 9/02</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/34008</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 8 juillet 1999 (08.07.99)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/02819 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 22 décembre 1998 (22.12.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/16727 24 décembre 1997 (24.12.97) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Albert Chânel, F-69009 Lyon (FR). <b>(74) Mandataire:</b> TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, DPI - 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR ENZYMATIC PREPARATION OF HOMOGENITISATE <b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE PREPARATION ENZYMATIQUE D'HOMOGENITISATE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a method for enzymatic preparation of homogentisate (HMO) from 4-hydroxypyruvate (HPP), characterised in that it consists in carrying out in a suitable reaction medium the following enzymatic reactions: enzymatic conversion of HPP into 4-hydroxyphenylacetate (HPA) with a first appropriate enzyme; then an enzymatic conversion of HPA into HMO with a second appropriate enzyme.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne un procédé de préparation enzymatique d'homogentisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes: conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis, conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.</p>		



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

### Procédé de Préparation enzymatique d'homogentisate

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation enzymatique d'homogentisate, ou acide 2,5-dihydroxy-phényl acétique (ci-après HMO).

5 L'HMO est un précurseur connu de molécules appelées les pigments ochronotiques qui sont des analogues de la mélanine. Ces molécules brunes sont d'ailleurs souvent citées comme "melanine like pigments", qui trouvent une application variée dans la cosmétique ou l'industrie pharmaceutique. L'addition de mélanine ou mélanine like pigments dans les laits solaires auraient un effet protecteur intéressant. Pour produire ces dérivés ochronotiques à  
10 partir d'HGA le procédé est simple puisque la molécule s'auto-oxyde rapidement en conditions alcalines. Différents procédés de préparation enzymatique d'HMO à partir d'acide l-phényl acétique ou de tyrosine sont décrits dans l'état de la technique (WO 93/08295 ou EP 343 330), de même que la préparation subséquente de mélanine.

On sait également que l'HMO est un composé essentiel à la vie des plantes. Dans les  
15 cellules végétales, l'HMO est le produit de transformation enzymatique du 4-hydroxyphénylpyruvate (ci-après HPP) par la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (ci-après HPPD). Les inhibiteurs de cette enzyme sont des composés herbicides qui bloquent la production d'HMO dans la cellule végétale (Pallett K. E. et *al.* 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). Lorsque l'on fait germer des plantes, d'*Arabidopsis thaliana* par exemple, sur milieu  
20 synthétique en présence d'un inhibiteur de l'HPPD, les plantes vont germer, rester blanches puis mourir très rapidement. Or, si dans le milieu synthétique additionné d'un inhibiteur de l'HPPD, on ajoute de l'HMO les plantes vont germer normalement et rester vertes tant que le milieu contiendra de l'HMO. Il est donc également important de pouvoir disposer d'HMO pour prévenir les carences des plantes liées à un dysfonctionnement métabolique de la  
25 biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP, et plus particulièrement un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP insensible aux inhibiteurs de l'HPPD.

Le procédé selon l'invention consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié  
30 les réactions enzymatiques suivantes:

- conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (ci-après HPA) par une première enzyme appropriée, puis

- conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.

La première réaction enzymatique suivante

4-hydroxyphénylpyruvate (HPP) ----> 4-hydroxyphénylacétate (HPA)

est catalysée par une HPP-oxydase appropriée. De telles oxydases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone, le transformant en HPA, plus particulièrement chez un *Arthrobacter* où une telle oxydase responsable d'une étape du catabolisme de la tyrosine (Blakley, E.R. 1977 Canadian Journal of Microbiology 23 1128-1139).

La deuxième réaction enzymatique suivante :

4-hydroxyphénylacétate (HPA) ----> homogentisate (HMO)

est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée. De telles hydroxylases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone, le transformant en HMO, plus particulièrement chez *Pseudomonas acidovorans*, souvent appelée *Comamonas acidovorans*. (Hareland. W.A. et al 1975 Journal of Bacteriology 121 272-285) chez certaines *Xanthobacter* (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1986 Antonie van Leeuwenhoek 52 309-318), chez *Pseudomonas alcaligenes* (Karigar C. S. et Pujar B. G. 1993 FEMS Microbiology Letters 110 59-64), chez *Flavobacterium* sp (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1988 Arch Microbiol. 149 207-213), chez *Bacillus subtilis* (Crawford R. L. 1978 FEMS Microbiology Letters 4 233-234), chez *Nocardia* sp DM1 (Raju S. G. et Vaidyanathan C. S. 1986 J.Indian Inst. Sci. 66 511-520) et chez *Rhodococcus erythropolis* (Suemori A. et al. 1996 Journal of Fermentation And Bioengineering Vol 81, N°2 133-137).

De manière avantageuse, l'HPA-hydroxylase employée dans le procédé selon l'invention est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les deux réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.

Les deux enzymes appropriées peuvent être introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme d'extrait protéique, ledit extrait protéique pouvant être brut ou purifié totalement ou en partie, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés. Elles peuvent être ainsi produites in situ par chaque organisme biologique

produisant naturellement les deux enzymes, ou encore par un seul organisme biologique modifié de manière qu'il produise les deux enzymes. Cet organisme biologique peut être une bactérie, une levure ou encore une cellule végétale.

Les deux enzymes étant insensibles aux inhibiteurs de l'HPPD, le procédé selon l'invention peut être conduit en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.

Le milieu réactionnel approprié est constitué par tout milieu aqueux dont les conditions de température, de pH et de force ionique sont appropriés pour les réactions enzymatiques. Lorsque les enzymes sont produites in situ par un ou plusieurs organismes biologiques, le milieu réactionnel est approprié pour la croissance desdits organismes.

En fin de réaction, l'HMO peut être isolé du milieu réactionnel et purifié, ou bien laissé dans le milieu réactionnel. Dans ce deuxième cas, le milieu réactionnel contenant l'HMO peut être employé comme milieu nutritif pour la culture de plantes, plus particulièrement pour la culture de plantes présentant un dysfonctionnement métabolique de la biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

#### **Exemple 1: Production d'HPA à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter***

##### Culture d'*Arthrobacter* :

*Arthrobacter globiformis* est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu A supplémenté avec 0,1% L-tyrosine et 0,01 % d'extrait de levure [milieu A composé en gramme par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5)  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (3,5)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{NaMoO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05)].

##### Extraction et dosage de l'activité HPP-oxidase.

A partir de 2,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 3000 xg pendant 15 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé. Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

30 Le culot de cellules, environ 3,4g est resuspendu dans 7 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0.05M pH7,5, TPP 0,1mM,  $\text{MgCl}_2$  0,1mM et mercaptoethanol 5mM) et soniqué à 23kHz pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à

44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant faisant 7 ml est additionné de 0,7 ml de protamine sulfate 2% dans le tampon d'extraction suivi d'une agitation douce. Le précipité qui se forme est éliminé par une centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le surnageant ainsi obtenu est  
5 additionné graduellement de sulfate d'ammonium pour arriver à 60% de la saturation. Cette nouvelle préparation est agitée 30 min. et le précipité formé récolté par centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le culot est resolubilisé dans 0,5 ml de tampon d'extraction et aliquoté en fractions de 0,1 ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

L'activité HPP-oxidase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200 µl de  
10 réaction par puits consistant en 149,8 µl de sodium phosphate 67 mM pH7,4, 10µl de glutathion 13,4mM, 10µl de MgCl<sub>2</sub> 67 mM, 10µl de TPP 26,7mM, 10µl de FAD 67µM, 0,2µl de protéine (soit environ 6µg) et 10 µl d'HPP 2,5mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2µl de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10mM dans un tampon  
15 phosphate contenant 20% DMSO.

La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 50 µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb  
20 ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%. TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)  
6 min.: 15% de tampon B  
6,5 min.: 15% de tampon B  
25 7 min.: 60 % de tampon B  
8 min.: 60 % de tampon B  
8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm.

Le HPA produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPP est comparé à une référence  
30 constituée d'HPA commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

#### Résultats.

L'analyse HPLC montre que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis*

cultivée sur tyrosine comme source majeure de carbone, est capable de transformer l'HPP en HPA (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HPA commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée par 100  $\mu$ M d'inhibiteur de l'HPPD.

5

**Exemple 2: Production d'HMO à partir d'HPA avec un extrait protéique de *Pseudomonas***

Culture de l'organisme.

*Pseudomonas acidovorans* est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures  
10 en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu B supplémenté avec 0.15% HPA et 0.01 % d'acide nitrilotriacétique. [ milieu B composé en gramme par litre de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1)  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (4,25)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,012)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,003)  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,003)  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2).]

Extraction et dosage de l'activité HPA-hydroxylase.

15 A partir de 0,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 7500 xg pendant 10 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé.  
Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

Le culot de cellules, environ 0,5 g est resuspendu dans 1,5 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0,1 M pH7,2, DTE 1 mM,  $\text{MgSO}_4$  5mM) et soniqué à 23 kHz  
20 pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à 44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant est aliquoté en fractions de 0,1ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

L'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200 $\mu$ l de réaction par puits consistant en 150  $\mu$ l de sodium phosphate 0,1M pH7,2, 10 $\mu$ l de DTE 20  
25 mM, 10 $\mu$ l de NADH 3 mM, 15 $\mu$ l de FAD 67 $\mu$ M, 10 $\mu$ l de protéine (soit environ 7 $\mu$ g) et 5  $\mu$ l d'HPA 10 mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2 $\mu$ l de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10 mM dans un tampon phosphate contenant 20% DMSO.

30 La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPA, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 $\mu$ l d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le

surnageant analysé par HPLC. 10µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5.5%, TFA 0.1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

5 0.8 min.: 0% de tampon B

1 min.: 60% de tampon B

1.7 min.: 60 % de tampon B

1.9 min.: 0 % de tampon B

5 min.: 0 % de tampon B

10 La détection est faite à 292 nm.

Le HMO produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPA est comparé à une référence constituée d'HMO commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

#### Résultats.

L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait de *Pseudomonas*  
15 *acidovorans* est capable de transformer l'HPA en HMO (la molécule produite co-migre parfaitement avec l'HMO commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée dans nos conditions de test par 100µM d'inhibiteur d'HPPD.

#### 20 **Exemple 3: Production d'HMO à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter* et de *Pseudomonas***

##### L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase

L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200µl de réaction par puits consistant en 100 µl de sodium  
25 phosphate 100 mM pH7.2, 10µl de DTE 20 mM, 10µl de NADH 3 mM, 15µl de FAD 67 µM, 10µl de glutathion 13,4 mM, 10µl de MgCl<sub>2</sub> 67 mM, 10µl de TPP 26,7 mM, 2µl d'extrait HPP-oxidase (soit environ 60 µg), 25µl d'extrait d'HPA-hydroxylase (soit environ 18 µg) et 10 µl d'HPP 10 mM.

La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant  
30 30 min sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 25µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb

ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

6 min.: 15% de tampon B

5 6,5 min.: 15% de tampon B

7 min.: 60 % de tampon B

8 min.: 60 % de tampon B

8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm et 292 nm simultanément

10 Résultats.

L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis* associé à celui de *Pseudomonas acidovorans* est capable de transformer simultanément l'HPP en HMO (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HM commercial de référence).



### Revendications

1. Procédé de préparation enzymatique d'homogénisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes:

- conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis
- conversion enzymatique de HPA en HMO par une enzyme deuxième appropriée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première conversion enzymatique est catalysée par une HPP-oxydase appropriée.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient d'*Arthrobacter*.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la deuxième conversion enzymatique est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les bactéries sont choisies parmi *Pseudomonas acidovorans*, *Xanthobacter*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Flavobacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Nocardia sp* DM1 et *Rhodococcus erythropolis*.

8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les deux réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les deux enzymes appropriées sont introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme d'extraits protéiques, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est réalisé en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.